

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 665 289 A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **95100764.0**

51 Int. Cl.⁶: **C12N 9/88, C07K 16/40,
G01N 33/68, C12N 15/07**

22 Anmeldetag: **20.01.95**

30 Priorität: **20.01.94 DE 4401629
04.02.94 DE 4403522
24.05.94 DE 4418091**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.08.95 Patentblatt 95/31

64 Benannte Vertragsstaaten:
AT CH DE ES FR GB IE IT LI NL SE

71 Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Sandhofer Strasse 112-132
D-68305 Mannheim-Waldhof (DE)**

72 Erfinder: **Endl, Josef, Dr.
Ulmenstrasse 12
D-82362 Weilheim (DE)
Erfinder: Stahl, Pter, Dr.
Hirtenstrasse 12
D-82347 Bernried (DE)
Erfinder: Albert, Winfried, Dr.
Hauptstrasse 16a
D-82390 Eberfing (DE)
Erfinder: Jung, Günther-Gerhard, Prof. Dr.
Ob der Grafenhalde 5
D-72076 Tübingen (DE)
Erfinder: Schendel, Dolores J., Prof. Dr.
Hans-Sachs-Strasse 123
D-80469 München (DE)
Erfinder: Meini, Edgar, Dr.
Stieglitz Weg 11
D-82152 Krailling (DE)
Erfinder: Dornmair, Klaus, Dr.
Auenstrasse 1a
D-82275 Emmering (DE)**

74 Vertreter: **Weiss, Wolfgang, Dr. et al
Postfach 860820
D-81635 München (DE)**

54 **Autoimmunreaktion hervorrufende GAD65 Peptide.**

57 Die Erfindung betrifft autoreaktive Peptide, Peptid-MHC-Komplexe, damit reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

EP 0 665 289 A2

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Autoimmunreaktion hervorrufende Peptide, Komplexe dieser Peptide mit Molekülen des Major Histocompatibility Komplex (MHC), mit den Peptiden oder/und den Komplexen aus Peptiden und MHC-Molekülen reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

5 Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie etwa der rheumatoiden Arthritis und des juvenilen Diabetes (IDDM), ist innerhalb der letzten Jahre schnell fortgeschritten und läßt mittlerweile konkrete Anwendungen für die frühe Diagnose und eine kausale Therapie dieser Erkrankungen erkennen.

10 Heute gilt als gesichert, daß bei der Entstehung dieser Erkrankungen neben einer genetischen Disposition auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auf der Ebene der genetischen Risikofaktoren sind z.B. bei dem IDDM nur einige wenige Allele der MHC-Klasse II-Antigene eng mit dieser Erkrankung assoziiert. Somit besteht die Möglichkeit, über eine Analyse dieser Allele eine Risikogruppe für IDDM zu definieren (vgl. z.B. Thomson et al., Am. J. Hum. Genet. 43 (1988), 799-816 oder Todd et al., Nature 329 (1987), 599-604).

15 Bei den an der Entstehung von IDDM beteiligten Umweltfaktoren handelt es sich wahrscheinlich um exogene, als Immunogen wirksame Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang werden u.a. virale Antigene, die partielle Homologien zu körpereigenen Strukturen aufweisen, diskutiert. Unter besonderen Umständen, insbesondere in der postnatalen Phase, können durch die Nahrung aufgenommene Antigene, wie z.B. Rinderserumalbumin, eine Immunantwort induzieren, welche aufgrund von Homologien zu körpereigenen
20 Strukturen einen autoaggressiven Prozeß in Gang setzen können.

Typisch für den Krankheitsverlauf bei IDDM ist die progressive Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch cytotoxische Lymphozyten. Dieser Prozeß setzt schon lange vor einer erkennbaren Störung des Glucosestoffwechsels ein. Bei einer erkennbaren Manifestation des Diabetes sind bereits über 90 % der β -Zellen zerstört. Es wäre deshalb außerordentlich wichtig, diese autoaggressiven T-Zellen frühzeitig bei Risikopersonen zu erfassen, um die betroffenen Individuen einer kausalen Therapie zuführen zu können.

25 Es gilt heute als gesichert, daß die Zerstörung von körpereigenem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen anfänglich sehr langsam verläuft. Im Anfangsstadium dieses Prozesses erkennen die autoaggressiven T-Zellen wahrscheinlich nur ein oder wenige Autoantigene. Arbeiten von Kaufman et al. (Nature 368 (1993), 69-72) und Tisch et al. (Nature 368 (1993), 72-78) an einem Tiermodell (NOD-Maus) des Typ I-Diabetes haben ergeben, daß beim spontan auftretenden Diabetes dieses Mausstammes die initiale, über T-Zellen vermittelte Auto-Immunreaktion gegen die Glutaminsäure-Decarboxylase gerichtet ist. Dabei werden in der
30 NOD-Maus anfänglich nur 1 bis 2 Epitope am C-Terminus der Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) erkannt. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich - wie oben ausgeführt - noch keine Veränderungen im Glucose-Metabolismus feststellen, während hingegen eine Perinsulitis bereits nachweisbar ist. Erst im weiteren Krankheitsverlauf weitet sich das Spektrum der von den autoaggressiven T-Zellen erkannten Peptide der GAD aus. Nach einer Manifestation des Diabetes sind auch präaktivierte T-Zellen gegen andere Inselzell-Antigene nachweisbar, z.B. Peripherin, Heat Shock Protein HSP 65 und Carboxypeptidase H.

35 Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen die Immunantwort gegen GAD ursächlich mit dem Entstehen des Typ I-Diabetes verknüpft ist. So lassen sich beispielsweise in über 80 % der Prädiabetiker Autoantikörper gegen GAD nachweisen, wobei die ätiologische Rolle dieser Autoantikörper allerdings gering eingeschätzt wird. Man nimmt vielmehr an, daß beim Typ I-Diabetes eine progressive Zerstörung der Pankreas- β -Zellen durch T-Lymphozyten vorliegt. Diese gegen GAD gerichteten T-Lymphozyten konnten bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen werden (Harrison et al., J. Clin. Invest. 89 (1992), 1161; Honeyman et al., J. Exp. Med. 177 (1993), 535). Die von diesen Gruppen gefundenen Autoantikörper
40 reagierten mit einem aus den Aminosäuren 208 bis 404 bestehenden Peptidfragment des GAD 67 kd Moleküls.

In EP-A-0 519 469 werden autoimmun reagierende Polypeptide aus dem humanen GAD 65 kd Molekül offenbart. Diese Polypeptide haben die Aminosäuresequenz:
X-P-E-V-K-(T oder E)-K-Z,

50 wobei X eine fakultative, aus 1 bis 10 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist und Z eine fakultative, aus 1 bis 8 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue autoreaktive Peptide bereitzustellen, die mit T-Zellen aus Typ I-Diabetikern, insbesondere mit T-Zellen aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern reagieren und somit frühe Auto-Epitope definieren.

55 Diese Aufgabe wird gelöst durch Peptide, Peptid-Derivate oder analog bindende Moleküle, die zum Nachweis, zur Isolierung, zur Vermehrung, zur Anergisierung oder/und zur Elimination autoreaktiver T-Zellen geeignet sind. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:

- (a) die Aminosäuresequenz (I)
G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,
(b) die Aminosäuresequenz (II)
E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,
- 5 (c) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,
(d) Teilbereiche der in (a), (b) oder/und (c) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und
(e) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c) oder/und (d) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.
- 10 Vorzugsweise umfaßt ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat
(a) die Aminosäuresequenz (I),
(b) die Aminosäuresequenz (II),
(c) Teilbereiche der Aminosäuresequenzen (I) oder/und (II) oder/und
(d) Aminosäuresequenzen mit einer im wesentlichen äquivalenten Spezifität oder/und Affinität der
15 Bindung an MHC-Moleküle wie die Aminosäuresequenzen aus (a), (b) oder/und (c).
Besonders bevorzugt umfaßt ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat den Teilbereich
L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F
der Aminosäuresequenz (I) oder eine davon abgeleitete Sequenz, bei der die N-terminale Sequenz L-P und die C-terminale Sequenz H-F konserviert sind.
- 20 Die Aminosäuresequenz (I) entspricht den Aminosäureresten 266 - 290 der humanen GAD 65 und die Aminosäuresequenz (II) der Aminosäuresequenz 306 - 325 der humanen GAD 65. Die in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen sind ebenfalls Teilsequenzen der humanen GAD 65.
Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Peptide, welche den Aminosäuresequenzen 266 bis 285 und 306 bis 325 der humanen GAD 65 entsprechen, eine spezifische Reaktion mit T-Zellsubpopulationen
25 zeigten, die aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern isoliert wurden. Somit handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Peptiden um frühe Autoepitope, mit deren Verwendung eine sehr frühe Diagnose des Typ I-Diabetes ermöglicht wird. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide auch therapeutisch angewendet werden, indem die mit den Peptiden reaktive T-Zellpopulation ausgeschaltet wird.
Bevorzugte Beispiele für T-Zellsubpopulationen, mit denen die erfindungsgemäßen Peptide der Aminosäuresequenzen (I) und (II) reagieren, sind die T-Zelllinien 6/7 und 6/10 oder T-Zellen mit einer äquivalenten Bindungsspezifität. Die T-Zelllinien 6/7 und 6/10 wurden am 10. Mai 1994 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, BRD unter den Nummern DSM ACC2172 (6/7) bzw. DSM ACC2173 (6/10) nach den Vorschriften des Budapester Vertrages hinterlegt.
- 30 Die Aminosäuresequenzen (I) und (II) sind Teilbereiche aus der 65 kD Isoform der humanen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), deren vollständige Aminosäuresequenz von Bu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2115 ff.) beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenzen (I) und (II) wurden durch Anlegen von T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von Typ I-Diabetikern und anschließende in vitro Stimulation mit GAD aus Schweinehirn und Testen dieser T-Zelllinien in einem Proliferationsassay mit synthetischen
35 Peptidsequenzen gefunden, die aus der humanen GAD-Sequenz abgeleitet wurden.
Die erfindungsgemäßen Peptide können durch bekannte Syntheseverfahren mittels chemischer Methoden erzeugt werden oder durch Klonierung und Expression einer für diese Peptide codierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere E.coli, auf gentechnische Weise hergestellt werden.
Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptide mit Teilbereichen der spezifisch angegebenen
45 Aminosäuresequenzen (I) oder (II) oder der in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen, die eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 10 Aminosäuren und am meisten bevorzugt von mindestens 15 Aminosäuren aufweisen. Die minimale Länge eines erfindungsgemäßen Peptids wird durch seine Fähigkeit bestimmt, ein MHC-Molekül zu erkennen, mit ihm spezifisch zu binden und mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor zu reagieren.
50 Die maximale Länge der aus der GAD stammenden und MHC-bindenden Abschnitte in einem erfindungsgemäßen Peptid beträgt vorzugsweise 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt 50 Aminosäuren und am meisten bevorzugt 25 Aminosäuren.
Neben Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) und (II) oder Teilbereichen davon betrifft die
55 Erfindung auch noch Peptide mit Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Sequenzen zeigen und die vorzugsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste oder kurzer Abschnitte von Aminosäureresten aus den Aminosäuresequenzen (I) oder (II) abgeleitet sind oder analog bindende

verfremdete Substanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch Peptidvarianten, die in ihrer Sequenz mit den oben genannten Aminosäuresequenzen nicht völlig übereinstimmen, sondern nur gleiche oder nahe verwandte "Ankerpositionen" aufweisen. Die Bezeichnung "Ankerposition" bedeutet in diesem Zusammenhang einen für die Bindung an ein MHC-Molekül, insbesondere an ein MHC-Molekül der Klassen DR3, DR4 oder DQ, wesentlichen Aminosäurerest. Die Ankerposition für das DRB10401-Bindungsmotiv sind z.B. bei Hammer et al., Cell 74 (1993), 197-203, angegeben. Derartige Ankerpositionen sind in erfindungsgemäßen Peptiden konserviert oder gegebenenfalls durch Aminosäurereste mit chemisch sehr nahe verwandten Seitenketten ersetzt (z.B. Alanin durch Valin, Leucin durch Isoleucin und umgekehrt). Die Bestimmung der Ankerpositionen in den erfindungsgemäßen Peptiden kann auf einfache Weise durch Tests von Varianten der oben angegebenen spezifischen Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-Moleküle erfolgen. Erfindungsgemäße Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide zeigen. Vorzugsweise besitzen die aus Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) oder (II) oder den in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen abgeleiteten Peptide eine Sequenzhomologie von mindestens 30 %, besonders bevorzugt von mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 % mit den Ausgangspeptiden oder Teilsequenzen davon.

Beispiele für Varianten der spezifisch angegebenen Peptide sind die entsprechenden homologen Peptidabschnitte aus der humanen GAD 67, deren vollständige Aminosäuresequenz ebenfalls von Bu et al., supra, beschrieben wurde.

Der Begriff "im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle" umfaßt auch eine gegenüber den Aminosäuresequenzen (I), (II) oder den in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen verbesserte Bindungsspezifität oder/und -affinität, die insbesondere bei verkürzten Peptiden gefunden wird, die eine Länge von vorzugsweise 8 bis 15 Aminosäuren besitzen.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptid-Derivate. Dieser Begriff umfaßt Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfindungsgemäßen Peptid-Derivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive Aminosäureseitengruppen, z.B. freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbonsäureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, z.B. Hydrochloride. Beispiele für Carboxylgruppenderivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxylgruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkyllderivate. Weiterhin umfaßt der Begriff Peptid-Derivat gemäß vorliegender Erfindung auch solche Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 "Standard"-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin, β -Alanin und 4-Aminobuttersäure.

Insbesondere sind solche Peptide bevorzugt, welche eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie Peptide mit den Aminosäuresequenzen (I) oder (II) aufweisen, die aber im Gegensatz zu diesen Peptiden keine Aktivierung von T-Zellen, sondern die Erzeugung eines anergen Zustands in T-Zellen hervorrufen.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Polypeptide erfaßt, in denen der MHC-bindende Peptidabschnitt Bestandteil einer größeren Polypeptideinheit ist, wobei die Verbindung von MHC-bindendem Peptid und dem Rest der Polypeptideinheit vorzugsweise eine Sollbruchstelle aufweist, z.B. eine Proteasespaltstelle.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Peptid oder Peptid-Derivat, das eine signalerzeugende Substanz bzw. eine Markierungsgruppe, z.B. eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe (z.B. Rhodamin, Phycoerythrin), Digoxin, Biotin, eine radioaktive Gruppe oder eine Toxingruppe (z.B. Ricin, Cholera toxin etc.) trägt. Durch Kopplung des erfindungsgemäßen Peptids mit Markierungsgruppen kann das Peptid als diagnostisches Mittel für in vivo oder in vitro (z.B. Imaging) Anwendungen oder als therapeutisches Mittel eingesetzt werden. Weiterhin kann das erfindungsgemäße Peptid auch beispielsweise in cyclisierter Form oder in oligomerer Form vorliegen, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind.

Die Erfindung betrifft auch peptidmimetische Substanzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide oder Peptid-Derivate zeigen. Peptidmimetische Substanzen oder Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen ersetzen können und gegenüber den nativen Peptiden eine erhöhte metabolische Stabilität, bessere Bioverfügbarkeit und größere Wirkungsdauer aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, Angew. Chem. 105 (1993),

1303-1326, Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006-2010 und Dorsch et al., Kontakte (Darmstadt) (1993) (2), 48-56. Bezüglich der Herstellung erfindungsgemäßer peptidmimetischer Substanzen wird auf die Offenbarung dieser Literaturstellen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex, der mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum und mindestens ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt. In diesem Komplex ist ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens 10^{-7} l/mol, besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-8} - 10^{-9} l/mol, an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden. Alternativ kann das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum auch kovalent an das MHC-Molekül gekoppelt sein, z.B. über einen Photolinker oder als kovalente genetische Peptid-MHC-Fusion. Ein derartiges Peptid-MHC-Fusionsprotein enthält vorzugsweise eine HLA-DR beta-Kette und ein damit genetisch fusioniertes autoreaktives Peptid. Besonders bevorzugt enthält der Komplex ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon.

Das MHC-Klasse II-Molekül ist vorzugsweise vom Typ DR, beispielsweise vom Typ DR1, DR2, DR3 oder DR4. Besonders bevorzugt ist das MHC-Klasse II-Molekül vom Subtyp DR B1 0101, DR B1 0301, DR B1 0401, DR B1 0402, DR B1 0404 oder DR B1 1601. Am meisten bevorzugt ist das MHC-Klasse II-Molekül vom Subtyp DR B1 0101 oder DR B1 0401. Die T-Zelllinie 6/7 (DSM ACC2172) proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz (I) in Anwesenheit der DR B1-Allele 0401 und 0101 oder/und 1601. Mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz (II) wird eine Proliferation in Gegenwart des DR B1-Allels 0401 gefunden. Die T-Zelllinie 6/10 (DSM ACC2173) proliferiert mit den autoreaktiven Peptiden der Aminosäuresequenzen (I) und (II) in Gegenwart des DR B1-Allels 0401.

Die Nukleotidsequenzen der für ein MHC-Klasse II-Molekül der obigen Subtypen kodierenden Gene sind veröffentlicht in Corell et al. (Mol. Immunol. 28 (1991), 533-543). Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit Bezug genommen.

Der Begriff "peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls" umfaßt Fragmente von MHC-Molekülen, die durch proteolytische Spaltung nativer MHC-Moleküle oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt sind und ihre peptidbindenden Eigenschaften im wesentlichen beibehalten haben. Weiterhin sind unter diesem Begriff Fusionsproteine zu verstehen, die neben einem für die Peptidbindung verantwortlichen MHC-Anteil noch weitere Polypeptid-Komponenten enthalten.

Die erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe werden vorzugsweise durch Assoziierung peptidfreier MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate mit den erfindungsgemäßen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika hergestellt. Die Herstellung von peptidfreien MHC-Molekülen kann beispielsweise durch Entfaltung von nativen MHC-Molekülen, um gebundene Peptide zu dissoziieren, und Rückfaltung der leeren MHC-Moleküle erfolgen (siehe Dornmair und McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 4134-4138 und WO91/14701).

Andererseits können peptidfreie MHC-Moleküle auch durch rekombinante Herstellung von MHC-Molekülen oder Derivaten davon gewonnen werden. Beispiele hierfür sind die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen in Fibroblasten (Germain und Malissen, Ann. Rev. Immunol. 4 (1990), 281-315) sowie die Expression von löslichen MHC-Klasse II-Molekül-derivaten ohne Membrananker in CHO-Zellen (Wettstein et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 219-228, Buelow et al., Eur. J. Immunol. 23 (1990), 69-76) und mittels des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen (Stern und Wiley, Cell 68 (1992), 465-477; Scheirle et al., J. Immunol. 149 (1992), 1994-1999). Auch MHC-Klasse I-Moleküle wurden in CHO-Zellen (Fahnestock et al., Science 258 (1992), 1658-1662) in Insektenzellen (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 12117-12120; Matsamura et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 23589-23595) sowie in Fibroblasten (Mage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10658-10661) exprimiert.

Weiterhin ist auch die Expression von peptidfreien MHC-Molekülen in E.coli bekannt (Parker et al., Mol. Immunol. 29 (1992), 371-378; Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 8403-8407; Garboczi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3429-3433; Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10330-10334). Auf die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Techniken zur rekombinanten Expression von MHC-Molekülen oder MHC-Molekül-derivaten wird für die vorliegende Erfindung Bezug genommen.

Vorzugsweise ist der MHC-Bestandteil des erfindungsgemäßen Komplexes ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon und besonders bevorzugt ein lösliches MHC-Molekül-derivat, bei dem der Membrananker teilweise oder vollständig deletiert ist.

Zur Identifizierung von MHC-Molekülen, welche das erfindungsgemäße autoreaktive Peptid präsentieren, werden die Antigen präsentierenden Zellen eines Spenders mit dem erfindungsgemäßen Peptid in markierter Form inkubiert, wobei vorzugsweise zuerst gebundene Peptide durch Denaturierung nativer MHC-Moleküle dissoziiert werden. Anschließend können die markierten MHC-Peptid-Komplexe mit Subtyp-spezifischen Antikörpern, die gegen Framework-spezifische Determinanten der MHC-Moleküle gerichtet

sind, immunpräzipitiert und aufgrund des Vorhandenseins der markierten Peptide identifiziert werden.

Alternativ können als Antigen präsentierende Zellen auch EBV (Epstein-Barr-Virus) transformierte B-Zellen des Spenders verwendet werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe aus einem rekombinanten MHC-Molekülderivat kann beispielsweise so erfolgen, daß DNA-Fragmente für die löslichen Teile der α - und β -Ketten eines MHC-Moleküls, z.B. eines MHC-DR3-, DR4- oder DQ-Moleküls durch PCR isoliert werden, wobei als Template cDNA aus einer EBV transformierten B-Zelllinie des Spenders benutzt wird, welche das entsprechende MHC-Molekül exprimiert. Bei diesem Schritt wird vorzugsweise am C-Terminus der α - und der β -Kette durch entsprechende Auswahl des PCR-Primers eine Reinigungshilfe, z.B. ein Oligohistidinsegment (z.B. ein Hexa-Histidin-Segment), eingeführt. Die PCR-Produkte können anschließend in E.coli subkloniert und als Inclusion-Bodies exprimiert werden. Die Inclusion-Bodies können nach bekannten Verfahren (vgl. Literaturstellen zur Expression von MHC-Molekülen in E.coli, supra) solubilisiert und die MHC-Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend werden die α - und β -Untereinheiten in Anwesenheit des Peptids renaturiert.

Der erfindungsgemäße Peptid-MHC-Komplex kann auch eine wie oben beschriebene Markierungsgruppe tragen, wobei die Markierungsgruppe sowohl am Peptidbestandteil als auch am MHC-Bestandteil des Komplexes durch bekannte Methoden gebunden sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein oligomerisierter Peptid-MHC-Komplex, der mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate enthält, die über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind. Ein derartiger oligomerisierter Peptid-MHC-Molekül-Komplex hat gegenüber bekannten (bezüglich des MHC-Moleküls) monomeren Komplexen den Vorteil einer höheren Affinität und somit einer verbesserten diagnostischen oder/und therapeutischen Wirksamkeit.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein derartiger oligomerisierter Komplex durch kovalente Quervernetzung von monomeren Peptid/MHC-Molekül-Komplexen über chemische Kopplungsreagenzien, z.B. N-Succinimidyl-3(2-pyridylthio)propionat, 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, Maleimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimidester, Bis(maleimidomethyl)ether, Disuccinimidylsuberat, Glutardialdehyd etc. nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Gegebenenfalls können auch einzelne Aminosäuren der Peptidkomponente oder der MHC-Komponente so verändert sein, daß spezielle Kopplungsreagenzien an dieser Stelle bevorzugt angreifen. So lassen sich durch Einführung von zusätzlichen Cystein- oder Lysin-Resten auf rekombinantem Wege bei der Proteinkomponente bzw. durch chemische Synthese bei der Peptidkomponente Kopplungen über SH-Linker bzw. über Aminogruppen erzielen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex so hergestellt werden, daß die an das MHC-Molekül bindende Peptidkomponente als Oligomer eingesetzt wird, d.h. als ein Peptidmolekül, das mindestens 2 MHC-bindende Bereiche enthält, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind. Diese Spacerregionen bestehen üblicherweise aus 10 - 15 Aminosäuren. Man verwendet kleine, hydrophile Aminosäuren, z.B. Glycin, Alanin, Serin, Prolin bzw. Kombinationen davon. Bei einer Renaturierung von peptidfreien MHC-Molekülen in Anwesenheit dieser Peptidoligomere entsteht der erfindungsgemäße oligomerisierte Komplex, der durch die oligomerisierte Peptidkomponente über nicht-kovalente Wechselwirkungen vernetzte MHC-Moleküle enthält.

Weiterhin können oligomerisierte Peptid-MHC-Komplexe durch Modifikation rekombinant hergestellter MHC-Moleküle erzeugt werden. So kann bei Herstellung der Vektoren für die Expression rekombinanter α - bzw. β -Ketten von MHC-Klasse II-Molekülen ein Gensegment, vorzugsweise jeweils am C-Terminus, einkloniert werden, das für ein Epitop codiert, das von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper kann vom IgG-Typ, vorzugsweise aber vom IgM-Typ sein. Die renaturierten monomeren Peptid/MHC-Komplexe werden dann mit einem, das eingeführte Epitop erkennenden Antikörper inkubiert, so daß nicht-kovalent vernetzte Immunkomplexe, bestehend aus mehreren Antikörpern und mehreren Peptid-MHC-Komplexen, erzeugt werden. Die Einführung von DNA-Segmenten, die für ein Epitop codieren, in die für die α - bzw. β -Kette des MHC-Moleküls codierenden DNA-Fragmente kann mittels bekannter molekularbiologischer Techniken erfolgen, z.B. durch Insertion in Restriktionsstellen oder durch zielgerichtete Mutagenese.

Der erfindungsgemäße oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex enthält vorzugsweise ein Peptid, das die Aminosäuresequenzen (I), (II), die in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen, Teilbereiche davon oder/und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen umfaßt, oder ein Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum davon. Der oligomerisierte Komplex kann vorzugsweise als diagnostisches oder therapeutisches Reagenz bei Typ I-Diabetes eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft somit auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält. Die Zusammensetzung kann weiterhin eine

akzessorische stimulierende Komponente enthalten, z.B. Cytokine wie IL-2 und IL-4 oder/und das Oberflächenantigen B7 (Wyss-Coray et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 2175-2180; Freeman et al., Science 262 (1993), 909-911), das mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf einer T-Zelle binden kann. Die Anwesenheit der akzessorischen stimulierenden Komponente kann die therapeutische Wirkung der Zusammensetzung verbessern oder/und modifizieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen, insbesondere für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen, z.B. Diabetes Typ I oder Typ II, vorzugsweise Diabetes Typ I.

Analoge diagnostische Anwendungen sind jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich. Beispiele derartiger Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, wo reaktive T-Zellen gegen das Myelin Basic Protein oder das Proteolipid-Protein bestimmt werden können, rheumatoide Arthritis, wo reaktive T-Zellen gegen Kollagen Typ II, Cytokeratine und Hsp 65 bestimmt werden können, Basedow-Krankheit, wo reaktive T-Zellen gegen Thyroidperoxidase bestimmt werden können.

Allgemein ist die diagnostische Anwendung bei allen Erkrankungen möglich, die das Immunsystem beeinflussen, wie z.B. auch bei der Arteriosklerose. Hier wurde eine Assoziation der Krankheit mit einer Immunantwort gegen das Heat Shock Protein Hsp 65 nachgewiesen (Xu et al., Lancet 341, 8840 (1993), 255-259).

Noch eine weitere Anwendung ist der diagnostische Nachweis von T-Zellen, die gegen Tumorantigene reagieren. Beispiele hierfür sind T-Zellen gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen MAGE 1, die aus Melanompatienten isoliert wurden (van der Bruggen et al., Science 254 (1991), 1643-1647). Der Nachweis dieser T-Zellen kann mit erfindungsgemäßen oligomerisierten Komplexen schon in einem Stadium erfolgen, in dem der Tumor aufgrund einer noch zu geringen Zellmasse mit herkömmlichen Methoden noch nicht nachweisbar ist. Ferner könnte der Nachweis von spezifisch reagierenden T-Zellen auch zur Verlaufskontrolle bei einer Anti-Tumorstimmung eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe, die vorzugsweise aus einer Körperflüssigkeit, z.B. Vollblut, stammt, mit einem erfindungsgemäßen Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einem erfindungsgemäßen Komplex in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen mit dem Peptid oder Komplex bestimmt. Eine spezifische Reaktion von T-Zellen mit dem Komplex oder dem Peptid kann z.B. durch eine erhöhte T-Zellenproliferation nachgewiesen werden, die sich durch den Einbau von Radioaktivität messen läßt. Andererseits kann die Reaktion von T-Zellen auch direkt durch Verwendung eines markierten Peptids oder Komplexes bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform werden das Peptid oder der Komplex vorzugsweise mit einer daran gekoppelten Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet. Die Auswertung kann beispielsweise durch FACS-Analyse erfolgen, wobei die T-Zellen mit einem ersten Fluoreszenzmarker, der an einen T-Zell-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, und dann mit dem Peptid- MHC-Komplex, der mit einem zweiten Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, in Kontakt gebracht werden und das Vorhandensein von doppelmarkierten Zellen durch fluorographische Analyse bestimmt wird. Auf diese Weise wird eine T-Zell-Subpopulation bestimmt, die durch ihre Reaktivität mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-Derivat oder/und mit einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex charakterisiert ist. Aufgrund der geringen Konzentration der spezifischen T-Zell-Population im Blut erfolgt als erster Schritt des Verfahrens vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, z.B. eine selektive Anreicherung von IL-2-Rezeptor-positiven T-Zellen durch Inkubation mit IL-2 oder/und durch Inkubation mit IL-2-Rezeptor-Antikörper und anschließende Separation der Antikörper-bindenden Zellen beispielsweise mit immunmagnetischen Methoden. Andererseits kann die Selektion auf präaktivierte Zellen erst nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex erfolgen.

In einer Abwandlung dieses Verfahrens kann auch das Verhältnis von präaktivierten autoreaktiven T-Zellen, d.h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor als Oberflächenmarker, zu nicht-aktivierten autoreaktiven T-Zellen, d.h. T-Zellen ohne den IL-2-Rezeptor, bestimmt werden.

Dieses Verfahren kann insbesondere zur Diagnose von Typ I-Diabetes, aber auch bei anderen das Immunsystem beeinflussenden Erkrankungen bzw. zur Diagnose einer Prädisposition für derartige Erkrankungen angewendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex

enthält, zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen. Zur therapeutischen Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide und der erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe können beispielsweise mit Toxinen gekoppelte Peptide oder Peptid-MHC-Komplexe verwendet werden, andererseits können aber auch Peptide alleine oder als Bestandteile des Komplexes eingesetzt werden, die zwar eine Bindung an den T-Zellrezeptor ermöglichen, aber keine Aktivierung der T-Zelle hervorrufen, d.h. die also anergisierend wirken.

Die therapeutische Wirkung derartiger anergisierender Peptidanaloga beruht darauf, daß der T-Zellrezeptor (TCR) zur Aktivierung der T-Zelle mit einem Peptid wechselwirken muß, das von einem MHC-Antigen der Klasse I oder Klasse II präsentiert wird. Dabei sind insbesondere Aminosäuren in Ankerpositionen des Peptids für die Bindung an das MHC-Molekül verantwortlich, während andere Aminosäuren im Peptid zur Wechselwirkung mit dem TCR beitragen und somit eine T-Zellstimulation hervorrufen. Durch Aminosäuresubstitutionen in den Peptiden können nun Peptidanaloga hergestellt werden, die aufgrund des Vorhandenseins der Ankerpositionen noch an das MHC-Molekül binden, andererseits aber nur eine partielle oder keine T-Zellaktivierung hervorrufen (vgl. z.B. Sloan-Lancaster et al., Nature 363 (1993), 156-159). Z.B. können solche Peptidanaloga bewirken, daß die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle hochreguliert wird (z.B. IL2-Rezeptor, LFA-1), daß jedoch keine Proliferation oder Cytokin-Expression erfolgt. T-Zellen, die mit einem solchen Peptidanalogen in Wechselwirkung treten, gehen in einen sogenannten anergen Zustand über, d.h. sie können auch durch eine nachfolgende reguläre Stimulation mit einem immunogenen Peptid nicht mehr proliferieren. Dieser anerge Zustand hält mindestens 7 Tage an und läßt sich deshalb therapeutisch bei der Behandlung einer Autoimmunerkrankung nutzen.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß das Peptid bzw. der Komplex aus Peptid und MHC-Molekül als Antigen verwendet werden kann. Ein derartiges Antigen kann dabei als Immunogen, d.h. als ein die Immunantwort stimulierendes Mittel oder als Tolerogen wirken, d.h. als ein Mittel, das eine Immuntoleranz hervorruft. Die Verwendung als Immunogen kann z.B. bei der Vakzinierung gegen Tumorantigene Verwendung finden. Statt den bisher zu diesem Zweck verwendeten ganzen Tumorzellen ist es möglich, daß von den T-Zellen erkannte tumorspezifische Peptide im Komplex mit dem entsprechenden MHC-Molekül, insbesondere in Form eines oligomerisierten Komplexes, zu injizieren, um eine T-Zellantwort gegen den Tumor zu erzeugen. Zur Erhöhung der Immunstimulation kann dieser Komplex auch in Kombination mit zusätzlichen stimulierenden Substanzen verabreicht werden. Zu diesem Zweck sind beispielsweise Cytokine, wie etwa IL2 oder IL4 geeignet, die gegebenenfalls und vorzugsweise kovalent mit dem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex verknüpft sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Assoziierung des Komplexes mit akzessorischen Komponenten für die T-Zellaktivierung, insbesondere mit für Antigen präsentierenden Zellen essentiellen Oberflächenmolekülen, z.B. dem Oberflächenmolekül B7.

Eine bevorzugte therapeutische Formulierung ist der Einbau von mit Peptid beladenen MHC-Molekülen in künstliche Vesikel, z.B. Lipidvesikel, die gegebenenfalls noch weitere membrangebundene Moleküle tragen können, wie z.B. B7 oder/und immobilisierte Cytokine.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von T-Zellsubpopulationen, die mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-MHC-Komplex reagieren. Bei einem solchen Verfahren bringt man eine T-Zellen enthaltende Probe, die z.B. aus einer Körperflüssigkeit stammt, die einem Patienten vorher entnommen wurde, mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex in Kontakt, identifiziert die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen und trennt sie gegebenenfalls von anderen T-Zellen ab. Auch hier kann vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, d.h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor, erfolgen.

Bei einem solchen Verfahren kann man das Peptid oder den Peptid-MHC-Komplex in immobilisierter Form auf einem Träger verwenden, wodurch die Abtrennung der positiv reagierenden T-Zell-Population von anderen T-Zellen vereinfacht wird. Aus den auf diese Weise isolierten T-Zell-Subpopulationen können durch Restimulation T-Zelllinien angelegt werden. Diese autoreaktive T-Zelllinien können dann zur Immunisierung von Patienten verwendet werden.

Eine spezifische Immuntherapie des Typ I-Diabetes umfaßt zunächst die Isolierung von spezifischen T-Zelllinien gegen ein Autoantigen, z.B. GAD 65 aus IDDM-Patienten. Dann erfolgt eine Bestimmung der Feinspezifität der T-Zelllinien, d.h. die Identifizierung der autoreaktiven Peptide. Für die spätere Inokulation der Patienten werden solche T-Zelllinien ausgewählt, die ein prädominantes Peptid erkennen, d.h. ein Peptid, gegen das mehrere der isolierten T-Zelllinien reagieren. Insbesondere handelt es sich dabei um T-Zelllinien, welche ein Peptid mit den Aminosäuresequenzen (I) oder (II) erkennen.

Falls sich bei einem Patienten kein eindeutig prädominantes Peptid findet, müssen für die spätere Inokulation mehrere T-Zelllinien gemischt werden. Die ausgewählten T-Zellklone werden vor der Inokulation

nochmals mit Antigen-präsentierenden Zellen und den entsprechenden Peptiden stimuliert, um eine gute Expression von Aktivierungsmolekülen und insbesondere der T-Zellrezeptoren zu gewährleisten. Dann werden die T-Zelllinien inaktiviert, z.B. durch Hitzebehandlung oder/und radioaktive Bestrahlung, vorzugsweise mit einer Dosis im Bereich von 4000 - 10000 rad, besonders bevorzugt ca. 8000 rad, und subkutan in einer Zellenzahl von vorzugsweise 10^7 bis 5×10^7 in den Patienten, aus dem sie gewonnen wurden, injiziert. Üblicherweise werden mindestens drei Injektionen über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten verteilt.

Anschließend kann man die T-Zellantwort des Patienten auf das Inokulat testen. Hierzu isoliert man die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) des Patienten, z.B. über Ficoll-Dichte-Gradientenzentrifugation, und testet die Proliferation gegen das Inokulat in einem Standard-Proliferationstest. Nach erfolgreich verlaufener Immunisierung sollte eine deutliche Proliferation der Patienten-PBLs gegen das Inokulat nachweisbar sein. Eine weitere Kontrolle des Immunisierungserfolgs kann durch Bestimmung der Frequenzen der GAD-reaktiven T-Zellen des Patienten im Verlauf der Immunisierung erfolgen. Dies kann z.B. nach dem Standardverfahren der Limiting Dilution mit autologen Stimulatorzellen erfolgen, die nach Inkubation mit GAD mit z.B. 4000 rad bestrahlt worden sein. Bei erfolgreich verlaufender Immunisierung nimmt die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen deutlich ab.

Nach weiterer Eingrenzung der von den regulatorischen T-Zellen erkannten Oberflächenstrukturen auf den T-Zellen des Inokulates kann auch mit Teilstrukturen der regulatorischen T-Zellen immunisiert werden, z.B. mit Segmenten des T-Zellrezeptors.

Andererseits können bei einer Antitumorvakzinierung auch teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden, die zu einer aktiven Immunisierung des Patienten gegen Tumorzellen führen können.

Bei den diagnostischen und therapeutischen Verfahren zur Identifizierung bzw. Aktivierung/Inhibierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptid-MHC-Moleküle auch ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet werden, der die Wirkung des MHC-Peptid-Komplexes nachahmt. Derartige Antikörper können ohne weiteres erhalten werden, indem eine gegen ein bestimmtes Peptid spezifische T-Zellsubpopulation als Immunogen zur Erzeugung eines Antikörpers (z.B. in einer Maus) verwendet wird oder indem zuerst ein erster Antikörper gegen den MHC-Peptid-Komplex und dann ein anti-idiotypischer Antikörper gegen den ersten Antikörper erzeugt wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Antikörper (erster Antikörper) gegen ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat oder einen erfindungsgemäßen Komplex, erhältlich durch Immunisierung, mit dem Peptid, Peptid-Derivat oder Komplex und Gewinnung eines durch Immunisierung erzeugten Antikörpers, vorzugsweise eines durch das Verfahren von Köhler und Milstein oder Weiterentwicklungen davon hergestellten monoklonalen Antikörpers.

Schließlich betrifft die Erfindung auch einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den ersten Antikörper, erhältlich durch Immunisierung mit dem ersten Antikörper, der gegen das Peptid oder Peptid-Derivat oder den Komplex gerichtet ist, und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen autoreaktiven Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder einem Komplex aus Peptid und MHC-Molekül reagiert. Bevorzugte Beispiele sind T-Zellen, die von den T-Zelllinien 6/7 (DSM ACC2172) oder 6/10 (DSM ACC2173) stammen oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweisen, d.h. ein von einem MHC-Molekül präsentiertes Peptid oder Peptid-Derivat der Aminosäuresequenzen (I) oder/und (II) oder/und Teilbereichen dieser Aminosäuresequenzen erkennen.

Weiter soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abbildungen 1 bis 4 erläutert werden.

- Abb. 1 zeigt erfindungsgemäße autoreaktive Aminosäuresequenzen,
- Abb. 2 zeigt weitere erfindungsgemäße autoreaktive Aminosäuresequenzen,
- Abb. 3 zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays der T-Zelllinie 6/7 mit Peptidpools,
- Abb. 4 zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays der T-Zelllinie 6/10 mit Peptidpools,
- Abb. 5 zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie 6/7 mit Einzelpeptiden aus Pool 7 und 11,
- Abb. 6 zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie 6/10 mit Einzelpeptiden aus Pool 7 und 11,

BEISPIEL 1

Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien

1. Primärstimulation

Durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation werden aus EDTA-Blut von Typ I-Diabetikern die peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs) gewonnen. Die Zellen werden 2 mal in RPMI-Medium gewaschen und dann in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 5 % Humanserum, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, aufgenommen. Pro Napf einer 96 Napf Rundboden-Platte werden 100 µl Zellsuspension, entsprechend 100000 Zellen, eingesät. Danach erfolgt die Zugabe von Schweine-GAD (SW-GAD) in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml. Die Zellen werden 3 - 4 Tage im Blutschrank bei 37 °C/7 % CO₂ inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgt Zugabe von 100 µl IL-2 (30 U/ml). Nach weiteren 3 - 4 Tagen werden von allen Kulturansätzen 100 µl abgesaugt und wie-derum 100 µl IL-2 (30 U/ml) zugegeben. Dies wird alle 3 - 4 Tage wiederholt.

2. Restimulation

Am Tag 14 nach dem Beginn der Primärstimulation erfolgt die erste Restimulation. Hierfür wird im Vergleich zur Primärstimulation die doppelte Anzahl von autologen PBLs mittels Ficoll isoliert und in Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 /ml eingestellt. Eine Hälfte dieser Stimulatorzellen wird mit dem Antigen SW-GAD (Endkonzentration 5 µg/ml) für 2 Stunden/37 °C/7 % CO₂ inkubiert (Antigen-Pulse). Die andere Hälfte wird unter gleichen Bedingungen ohne Antigen, nur mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend werden alle Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt. Die Stimulatorzellen werden dann in 96 Napf Rundboden-Platten verteilt (je 100000 Zellen/Napf) und zwar so, daß immer ein Napf mit Antigen enthaltenden Stimulatorzellen benachbart zu einem Loch mit Stimulatorzellen ohne Antigen zu liegen kommt.

Anschließend erfolgt die Präparation der T-Zellen aus den Primärstimulationsansätzen. Hierfür werden die Überstände aus den Primärstimulationsansätzen abgesaugt und die Zellen in den Platten zweimal mit je 100 µl Waschmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium = DMEM) gewaschen. Dazwischen werden die Zellen in den Platten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in je 100 µl Kulturmedium aufgenommen und je 50 µl auf zwei benachbarte Näpfe der Restimulations-Platte verteilt. Auf diese Weise werden die T-Zellen in einem Napf mit Antigen inkubiert und im benachbarten Napf ohne Antigen kann die Antigen-Spezifität der Restimulation kontrolliert werden.

Ab dem 2. oder 3. Tag nach dem Beginn der Restimulation kann die Proliferation mikroskopisch beurteilt werden. Dabei werden nur solche Mikrokultur-Pärchen als relevant angesehen, bei denen nur im Napf mit Antigen-Anwesenheit Proliferation erfolgt. Ab Tag 4 wird wiederum zu jedem Kultur-Napf 100 µl IL-2 (30 U/ml) zugegeben. Bis zum Tag 14 wird alle 3 - 4 Tage ca. 50 % des Kulturmediums gegen IL-2 (30 U/ml) ausgetauscht.

Bei gutem Wachstum werden die Kulturen auf mehrere 96er Näpfe aufgeteilt. Bei späteren Restimulationen kann auch in größere Näpfe aufgeteilt werden. Alle 2 Wochen erfolgt eine erneute Restimulation nach der oben beschriebenen Methode. Ab der 3. Restimulation wird die Spezifität der Mikrokulturen in einem Proliferationstest ermittelt.

3. Proliferationstest mit SW-GAD

Alle Tests werden mindestens in Doppel-Ansätzen durchgeführt.

a) Stimulator-Zellen:

Als Stimulatorzellen werden autologe PBLs oder in den HLA-Klasse II Antigenen identische PBLs eines normalen Spenders verwendet. Die PBLs werden wie unter Absatz 2. beschrieben mit Antigen vorinkubiert, mit 4000 rad bestrahlt und in 96 Napf-Platten verteilt (100000 Zellen/Loch).

b) T-Zellen

Die verwendeten T-Zellen stammen immer aus der Abschlußphase einer Restimulationsperiode. Sie werden 3 mal mit DMEM von Antigen und IL-2-freigewaschen und mit 6000 Zellen/96er Napf verteilt. Die

auf diese Weise isolierten T-Zelllinien 6/7 und 6/10 wurden bei der DSM unter den Nummern DSM ACC2172 bzw. DSM ACC2173 nach den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt.

Zusätzlich zu den Ansätzen mit SW-GAD werden Kontrollen ohne GAD inkubiert.

Nach 3 - 4 Tagen bei 37 °C/7 % CO₂ erfolgt die Zugabe von 1 µCi ³H-Thymidin und weitere Inkubation für 16 - 20 Stunden. Danach erfolgt das Übertragen der Zellen auf einen Glasfaserfilter mittels eines Zellen-
 5 Ernte Gerätes und die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im β-Zählgerät.

Tabelle 1 zeigt ein typisches Ergebnis eines Proliferationstests mit SW-GAD.

Tabelle 1

10

15

Ergebnisse des Proliferationstests der T-Zelllinien 6/7 und 6/10 mit SW-GAD		
Zelllinie	Kontrolle ohne Antigen	cpm SW-GAD
6/7	129	9373
6/10	117	5222

4. Proliferationstest mit Peptiden, die aus der H-GAD Sequenz abgeleitet sind

20

T-Zelllinien, die über mindestens 4 Restimulationsrunden expandiert wurden und mit SW-GAD im Proliferationstest reagierten, wurden zusätzlich mit überlappenden Peptiden der H-GAD getestet. Diese Experimente haben zum Ziel, die von den T-Zellen erkannten Epitope der H-GAD zu definieren. Dazu werden zunächst sich überlappende 20 mer Peptide der H-GAD synthetisiert (Überlappungsbe- reich 10
 25 Aminosäuren, insgesamt 59 verschiedene Peptide).

Jeweils 4-5 dieser Peptide werden zu einem Pool vereinigt und in einer Endkonzentration von je 18 µg/ml zu den Stimulatorzellen gegeben (Präparation der Stimulatorzellen wie unter Abschnitt 3a beschrieben). Die weitere Behandlung dieser Stimulatorzellen wird wie unter Abschnitt 3a beschrieben, durchgeführt.

Danach erfolgt die Zugabe von 6000-20.000 T-Zellen pro Mikrokultur-Napf. Das weitere Verfahren ist analog dem unter Abschnitt 3b beschriebenen.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen Ergebnisse eines Proliferationsassays der T-Zelllinien 6/7 und 6/10 unter Verwendung von Peptidpools der humanen GAD 65 kd. Beide T-Zelllinien proliferieren stark mit Peptiden aus dem Pool 11. Eine geringere, aber signifikante Proliferation ist auch mit Pool 7 zu beobachten.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen Ergebnisse des Proliferationsassays der T-Zelllinien 6/7 und 6/10 mit 10 µg/ml Einzelpeptiden aus den Pools 7 bzw. 11. Beide Zelllinien zeigen eine signifikante Proliferation mit dem Peptid 5G1 (entsprechend den Aminosäuren 266-285 der humanen GAD 65) und eine geringere, jedoch signifikante Proliferation mit dem Peptid 5F3 (entsprechend den Aminosäuren 306-325 der humanen GAD 65).

40 BEISPIEL 2

Verfahren zur Isolierung und Bestimmung einer antigenspezifischen T-Zellsubpopulation

Da antigenspezifische, insbesondere gegen Auto-Antigene gerichtete T-Lymphozyten im peripheren Blut in sehr niedriger Zahl auftreten (erwartete Frequenz 10⁻⁵ - 10⁻⁶), bietet sich an, die in vivo präaktivierten T-Zellen über einen Selektionsschritt zunächst anzureichern.
 Dies kann durch zwei Verfahren erzielt werden:

1. Expansion der in vivo präaktivierten T-Zellen durch Inkubation mit IL-2

50

Dazu werden PBLs mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und in Zellkultur-Medium mit IL-2 (RPMI 1640/5 % Humanserum/30 U/ml IL-2) auf 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden in 200 µl Aliquoten auf 48 Napfplatten verteilt und 7 Tage inkubiert. Nach 4 Tagen wird zusätzlich noch einmal IL-2 zugegeben. Da präaktivierte T-Zellen den hochaffinen IL-2 Rezeptor exprimieren, proliferieren selektiv die
 55 in vivo präaktivierten T-Zellen während dieser Stimulationsperiode und reichern sich in der Primärkultur an. Nach Abschluß der Stimulationsperiode werden die Zellen in den einzelnen Nöpfen gewaschen, gezählt und in einem Proliferationstest verwendet.

2. Anreicherung von in vivo präaktivierten T-Zellen durch immunmagnetische Separation

Hierzu werden die Ficoll- isolierten PBLs mit monoklonalen Antikörpern gegen den hochaffinen IL-2 Rezeptor inkubiert (7×10^6 PBLs/ml; $10 \mu\text{g/ml}$ anti IL-2 Rezeptor Antikörper (Boehringer Mannheim); 30 min bei 4°C). Anschließend wird die Zellsuspension zweimal mit eiskaltem RPMI/10 % Humanserum (HS) gewaschen (400 g/10 min) und dann die Suspension auf eine Zelldichte von $1 - 3 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt. Dazu werden mit Schaf-anti Maus-Antikörper gekoppelte Dynabeads M-280 der Firma Dynal gegeben (Verhältnis Dynabeads zu Zielzellen ca. 10 - 15). Die Suspension wird bei 4°C auf einem Roller sehr langsam bewegt. Danach wird die Suspension mit RPMI/10 % HS 10-fach verdünnt und für 1 - 2 Minuten in den zuvor gekühlten Magnetpartikel-Konzentrierer (MPC) gestellt. Nachdem die rosettierten IL-2 Rezeptor tragenden T-Zellen vom Magneten immobilisiert sind, wird der Überstand abgesaugt, das Inkubationsgefäß aus dem MPC entfernt und die verbleibenden Zellen mit RPMI/10 % HS resuspendiert. Die Abtrennung der Zielzellen erfolgt noch einmal im MPC. Dieser Waschschrift wird noch einmal wiederholt. Anschließend werden die separierten Zellen in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl auf $1 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt. Die Magnetobeads werden nach bekannten Verfahren über die Detacher Antikörper entfernt.

Die über die Verfahren nach 2.1 oder 2.2 angereicherten präaktivierten Zellen werden anschließend auf Reaktivität gegen die Auto-Antigen Peptide bzw. gegen einen Peptid/MHC-Komplex getestet.

Auch hier bieten sich mehrere Verfahren an:

3. Proliferationstest mit bestrahlten Stimulatorzellen und Peptiden als Antigene

Zunächst präpariert man autologe Stimulatorzellen aus Ficollisolierten PBLs. Die Stimulatorzellen werden auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium eingestellt und mit den Peptiden (Endkonzentration $10 \mu\text{g/ml}$) für 2 Stunden/ 37°C / 7 % CO_2 inkubiert. Danach werden die Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt und anschließend in einer Zellzahl von 100000 Zellen/Napf in einer 96 Napf-Rundbodenplatte verteilt.

Dazu gibt man je 100000 der aus 2.1 oder 2.2 gewonnenen in vivo präaktivierten T-Zellen und inkubiert für 4 Tage/ 37°C / 7 % CO_2 . Dann wird die Hälfte des Ansatzvolumens gegen IL-2 (30 U/ml) ausgetauscht. Dies geschieht nach weiteren 4 Tagen noch einmal.

Am Tag 12 nach dem Start der Mikrokulturen wird der eigentliche Proliferationstest durchgeführt. Dazu werden zuerst die Mikrokulturen zweimal mit DMEM gewaschen, um Antigen und IL-2 zu entfernen. Jede Kultur wird in vier Aliquots aufgeteilt und in Duplikaten in der Anwesenheit von 100000 autologen, bestrahlten PBLs, jeweils mit oder ohne Peptid-Pulse, für 3 Tage inkubiert (37°C / 7 % CO_2). Nach dieser Zeit wird 3H -Thymidin zugegeben und nach weiteren 16 - 20 Stunden die eingebaute Radioaktivität bestimmt.

4. Direkter Nachweis der Antigen-reaktiven T-Zellen durch Markierung über einen oligomeren Peptid/HLA-Komplex

Hierfür verwendet man die nach der Methode 2.2 angereicherte in vivo präaktivierten T-Zellen. Die Zellen werden in RPMI/10 % HS auf eine Konzentration von $10^6/\text{ml}$ eingestellt und mit dem oligomerisierten, mit einer Fluoreszenz-Markierung versehenen HLA-Peptid-Komplex bei 4°C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit eiskaltem Zellkultur-Medium zweimal gewaschen. Die Analyse der Fluoreszenz-markierten Zellpopulation erfolgt im Durchflußcytometer.

Beispiel 3

Identifizierung von MHC-Molekülen, welche ein definiertes autoreaktives Peptid präsentieren

Hierzu werden zunächst die Peptide mit ^{125}J markiert, z.B. nach der Methode von Bolton und Hunter (Bolton, A.E. and Hunter, W.M., Biochem. J. 133 (1993), 529-531). Dann werden $2 - 5 \times 10^6$ PBLs des Spenders mit dem zu untersuchenden MHC-Typ in Zellkulturmedium mit ^{125}J -markierten Peptiden ($2 - 10 \mu\text{M}$) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen werden diese in einem Lysepuffer, bestehend aus 0,5 % NP 40; 0,5 % Mega9; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; $50 \text{ mM Tris pH 7,5}$; $2 \text{ mM Phenylmethylsulfonylfluorid}$) lysiert. Aus der Mischung werden die MHC-Moleküle durch an Protein A-Sepharose gebundene Frameworkspezifische monoklonale Antikörper (z.B. im Falle von HLA-DR mit dem monoklonalen Antikörper L243 (ATCC HB 55)) immunpräzipitiert und die an die Protein A-Sepharose gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter bestimmt.

BEISPIEL 4

Bestimmung des Subtyps von MHC-Molekülen, die den T-Zelllinien 6/7 (DSM ACC2172) und 6/10 (DSM ACC2173) autoreaktive Peptide präsentieren

5

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog dem Beispiel 1.3. Als Antigen-repräsentierende Zellen wurden allerdings keine autologen PBLs verwendet, sondern PBLs von heterologen Donoren, welche nicht komplett, sondern nur in definierten MHC-Allelen mit den MHC-Molekülen des Donors, aus dem auch die T-Zelllinien entwickelt wurden, übereinstimmen. Die Proliferationstests wurden unter Verwendung der autoantigenen Peptide 5G1 (entsprechend den Aminosäuren 266-285 der humanen GAD65) und 5F3 (entsprechend den Aminosäuren 306-325 der humanen GAD65) durchgeführt.

Die Tabelle 3 zeigt das Ergebnis eines solchen Testansatzes. Die T-Zelllinien 6/7 und 6/10 proliferieren mit beiden Peptiden in Anwesenheit des DR B1-Allels 0401. Eine Variation der DQ A1- bzw. DQ B1-Allele ist ohne Einfluß auf die Stimulierbarkeit der T-Zelllinien. Die T-Zelllinie 6/7 erkennt das Peptid 5G1 zusätzlich in Assoziation mit den Allelen DR B1 0101 oder/und 1601.

20

25

30

35

40

45

50

55

T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit den Peptiden 5G1 und 5F3 unter Verwendung von PBLs mit verschiedenen Haplotypen als Antigen-präsentierende Zellen

Tabelle 3

Spender	Haplotyp der APC DR B1* DQ A1* DQ B1*	Identität der Allele mit den Allelen des Spenders der TCL	TCL 6/7 cpm +Peptid SI	TCL 6/10 cpm +Peptid SI
A.K.	0301 0501 0201	DR: 2 Allele ident. DQ: 4 Allele ident.	5G1 55,0 5F3 3,8	5G1 6,0 5F3 3,8
	0401 0301 0302			
G.H.	0301 0501 0201	DR: 1 Allel ident. 1 Allel nicht ident. DQ: 4 Allele ident.	5G1 0,9 5F3 0,6	5G1 1,5 5F3 1,5
	0404 0301 0302			
G.E.	1302 0102 0604	DR: 1 Allel ident. 1 Allel nicht ident. DQ: 2 Allele ident. 2 Allele nicht ident.	5G1 67,8 5F3 7,0	5G1 22,6 5F3 6,5
	0401 0301 0302			
19	0301 0501 0301	DR: 2 Allele ident. DQ: 1 Allel ident. 3 Allele nicht ident.	5G1 45,7 5F3 3,1	5G1 8,5 5F3 2,8
	0401 0201 0301			
D.J.	0101 0101 0501	DR: 2 Allele nicht ident. DQ: 4 Allele nicht ident.	5G1 28,6 5F3 1,2	5G1 2,2 5F3 1,4
	1601 0102 0502			

TCL = T-Zelllinie

APC = Antigen-präsentierende Zellen

SI = Stimulationsindex: cpm in Anwesenheit des Peptides
dividiert durch cpm ohne Peptid.

BEISPIEL 5

Proliferationstest mit Varianten des Peptids 5G1 unter Verwendung der T-Zelllinie 6/10

- 5 Um die Kernstruktur des stimulierenden Peptids 5G1 aufzuklären, wurden Proliferationstests mit verschiedenen Varianten dieses Peptids unter Verwendung der T-Zelllinie 6/10 durchgeführt (siehe Tabelle 4).

- Ein Test mit einer ersten Serie von 20 mer-Varianten sollte entschlüsseln, ob an die 5G1-Struktur am C- bzw. N-Terminus angrenzende Aminosäuren eine Rolle bei der Erkennung durch die T-Zelllinie 6/10 spielen.
10 Wie die Stimulationsindices zeigen, bringt eine Verschiebung des 20mer Peptids in Richtung C-Terminus keinen Gewinn an Proliferationsaktivität. Eine Verschiebung um 6 Aminosäuren in Richtung N-Terminus führt zu einem Verlust an Stimulationskapazität.

- Ein Test mit einer zweiten Serie von Peptidvarianten untersucht den Einfluß einer Verkürzung am C-Terminus. Aus dieser Serie von Experimenten geht hervor, daß die C-terminalen Aminosäurereste Histidin
15 (H) und Phenylalanin (F) für die Stimulationskapazität bedeutsam sind.

- Ein Test mit einer dritten Serie von Peptidvarianten hatte das Ziel, den N-Terminus des minimalen stimulationsaktiven Peptids zu definieren. Entfernt man von einem 18mer mit intaktem C-Terminus die Aminosäuren Leucin (L) und Prolin (P), so kommt es zu einem starken Abfall des Stimulationsindex. Der N-Terminus ist somit durch L und P definiert. Eine weitere Verkürzung um H und F am C-Terminus führt
20 ebenfalls zu einem Verlust an Stimulationsaktivität. Somit ist für die T-Zelllinie 6/10 das minimale, noch stimulierende Peptid ein 14mer der Sequenz LPRLIAFTSEHSF.

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 4

Reaktion von TCL 6/10 mit Varianten des Peptids 5G1 zur
 Identifizierung der minimalen, noch stimulationsaktiven
 Peptidstruktur

10	Peptid-Varianten von 5G1	Stimulations- index
5G1	GMAALPRLIAFTSEHSHFSL	5,4
15	ALPRLIAFTSEHSHFSLKKG	3,0
	RLIAFTSEHSHFSLKKGAAA	3,2
	PEVKEKGMAALPRLIAFTSE	0,6
20	AALPRLIAFTSEHSHFSL	4,5
	AALPRLIAFTSEHSHF	2,9
	AALPRLIAFTSEHS	0,7
25	AALPRLIAFTSE	0,6
	GMAALPRLIAFTSE	0,8
	GMAALPRLIAFT	1,0
30	LPRLIAFTSEHSHFSLKK	3,2
	RLIAFTSEHSHFSL	1,4
35	LPRLIAFTSEHSHF	4,6
	LPRLIAFTSEHS	0,4

40

45

50

55

SEQUENZPRCTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Strasse 112-132
- (C) ORT: Mannheim-Waldhof
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 68305
- (G) TELEFON: 0621/759-4337
- (H) TELEFAX: 0621/759-4457

10

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Antigen-spezifische, aktivierte T-Lymphozyten, Nachweis und Anwendung

15

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 23

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

20

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE P4401629.8
- (B) ANMELDETAG: 20-JAN-1994

25

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE P4403522.5
- (B) ANMELDETAG: 04-FEB-1994

30

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 4418091.8
- (B) ANMELDETAG: 24-MAY-1994

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Met Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Ala Phe Thr Ser Glu His Ser
1 5 10 15

45

His Phe Ser Leu Lys Lys Gly Ala Ala
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Leu Ala Phe Leu Gln Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Leu Ala Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

10 Leu Leu Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

25 Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp Leu Leu Pro Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

40 Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg Ser Thr Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

55

Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met Arg Glu Ile Ile Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe Lys Met Phe Pro
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly Gly Gly Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Trp Gly Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys
1 5 10

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp Gly Lys Pro Gln His Thr
1 5 10

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu

55

1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Leu Val Ser Ala Thr Ala Gly Thr Thr Val Tyr Gly Ala Phe
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Tyr Ile Pro Pro Ser Leu Arg Thr Leu Glu Asp Asn Glu Glu
 1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Val Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe
1 5 10

Patentansprüche

1. Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz (I)

G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,

(b) die Aminosäuresequenz (II)

E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,

(c) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,

(d) Teilbereiche der in (a), (b) oder/und (c) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(e) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c) oder/und (d) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

2. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1, umfassend

(a) die Aminosäuresequenz (I),

(b) die Aminosäuresequenz (II),

(c) Teilbereiche der Aminosäuresequenzen (I) oder/und (II) oder/und

(d) Aminosäuresequenzen mit einer im wesentlichen äquivalenten Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die Aminosäuresequenzen aus (a), (b) oder/und (c).

3. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren aufweist.

4. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren aufweist.

5. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Länge von bis zu 25 Aminosäuren aufweist.

6. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Markierungsgruppe trägt.

7. Peptidmimetikum,

dadurch gekennzeichnet,

daß es eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6 aufweist.

8. Komplex, der mindestens ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Peptidmimetikum nach Anspruch 7 umfaßt, das an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden ist.

9. Komplex nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.
- 6 10. Komplex nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das MHC-Klasse II-Molekül den Typ DR1, DR2, DR3 oder DR4 aufweist.
11. Komplex nach Anspruch 10,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
daß das MHC-Klasse II-Molekül den Subtyp DR B1 0101, DR B1 0301, DR B1 0401, DR B1 0402, DR B1 0404 oder DR B1 1601 aufweist.
12. Komplex nach Anspruch 11,
15 **dadurch gekennzeichnet,**
daß das MHC-Klasse II-Molekül den Subtyp DR B1 0101 oder DR B1 0401 aufweist.
13. Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß er ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.
14. Komplex nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein lösliches peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt.
25
15. Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er eine Markierungsgruppe trägt.
- 30 16. Oligomerisierter Peptid-MHC-Molekül-Komplex, der mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-
derivate enthält, die über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.
17. Oligomerisierter Komplex nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß er durch chemische Kopplungsreagenzien quervernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.
18. Oligomerisierter Komplex nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß er durch eine oligomerisierte Peptidkomponente mit mehreren MHC-bindenden Bereichen vernetzte
40 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält.
19. Oligomerisierter Komplex nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß er durch Antikörper vernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.
45
20. Oligomerisierter Komplex nach einem der Ansprüche 16 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß er MHC-Moleküle wie in einem der Ansprüche 9 bis 14 definiert enthält.
- 50 21. Oligomerisierter Komplex nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein
Peptidmimetikum nach Anspruch 7 enthält.
- 55 22. Pharmazeutische Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, ein Peptidmimetikum nach
Anspruch 7 oder/und einen Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 21 als aktive Komponente

gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente umfaßt.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die akzessorische stimulierende Komponente ausgewählt ist aus Cytokinen oder/und dem Oberflächenantigen B7.
25. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen.
15
26. Verwendung nach Anspruch 25 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.
- 20 27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Diabetes oder einer Prädisposition für Diabetes.
28. Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 7 oder/und einem Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 21 in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen in der Probe mit dem Peptid oder Komplex bestimmt.
- 30 29. Verfahren nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Reaktion der T-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid oder Komplex durch FACS-Analyse bestimmt.
- 35 30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß man vor und/oder nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
- 40 31. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen.
32. Verwendung nach Anspruch 31 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Autoimmunerkrankungen.
45
33. Verwendung nach Anspruch 31 oder 32 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Diabetes.
- 50 34. Verwendung eines Peptids oder Peptid-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 6, eines Peptidmimetikums nach Anspruch 7 oder eines Komplexes nach einem der Ansprüche 8 bis 21 zur Herstellung eines Antigens, insbesondere eines Immunogens oder Toleorgens.
35. Verfahren zur Isolierung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation,
dadurch gekennzeichnet,
55 daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 7 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 21 in Kontakt bringt, die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen

identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.

36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß man vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
37. Verwendung von nach dem Verfahren gemäß Anspruch 35 isolierten T-Zellen oder Teilstrukturen davon zur Herstellung eines Antigens.
- 10 38. Verwendung nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die T-Zellen oder Teilstrukturen davon in den Patienten, aus dem sie ursprünglich stammen, reinjiziert werden.
- 15 39. Verwendung nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß inaktivierte T-Zellen reinjiziert werden.
- 20 40. Verwendung nach Anspruch 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden.
- 25 41. Antikörper gegen ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 7 oder einen Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 21, erhältlich durch Immunisierung mit dem Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten Antikörpers.
- 30 42. Anti-idiotypischer Antikörper gegen einen Antikörper nach Anspruch 41, erhältlich durch Immunisierung mit dem Antikörper gegen das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder den Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.
- 35 43. T-Zelle, die mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 7 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 8 bis 15 oder 21 reagiert.
44. T-Zelle nach Anspruch 43, die von der T-Zelllinie 6/7 (DSM ACC2172) stammt oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweist.
- 40 45. T-Zelle nach Anspruch 43, die von der T-Zelllinie 6/10 (DSM ACC2173) stammt oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweist.

45

50

55

Abb. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

Abb. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

Abb. 3

Proliferationsassay Pat. 6/7 mit Peptiden

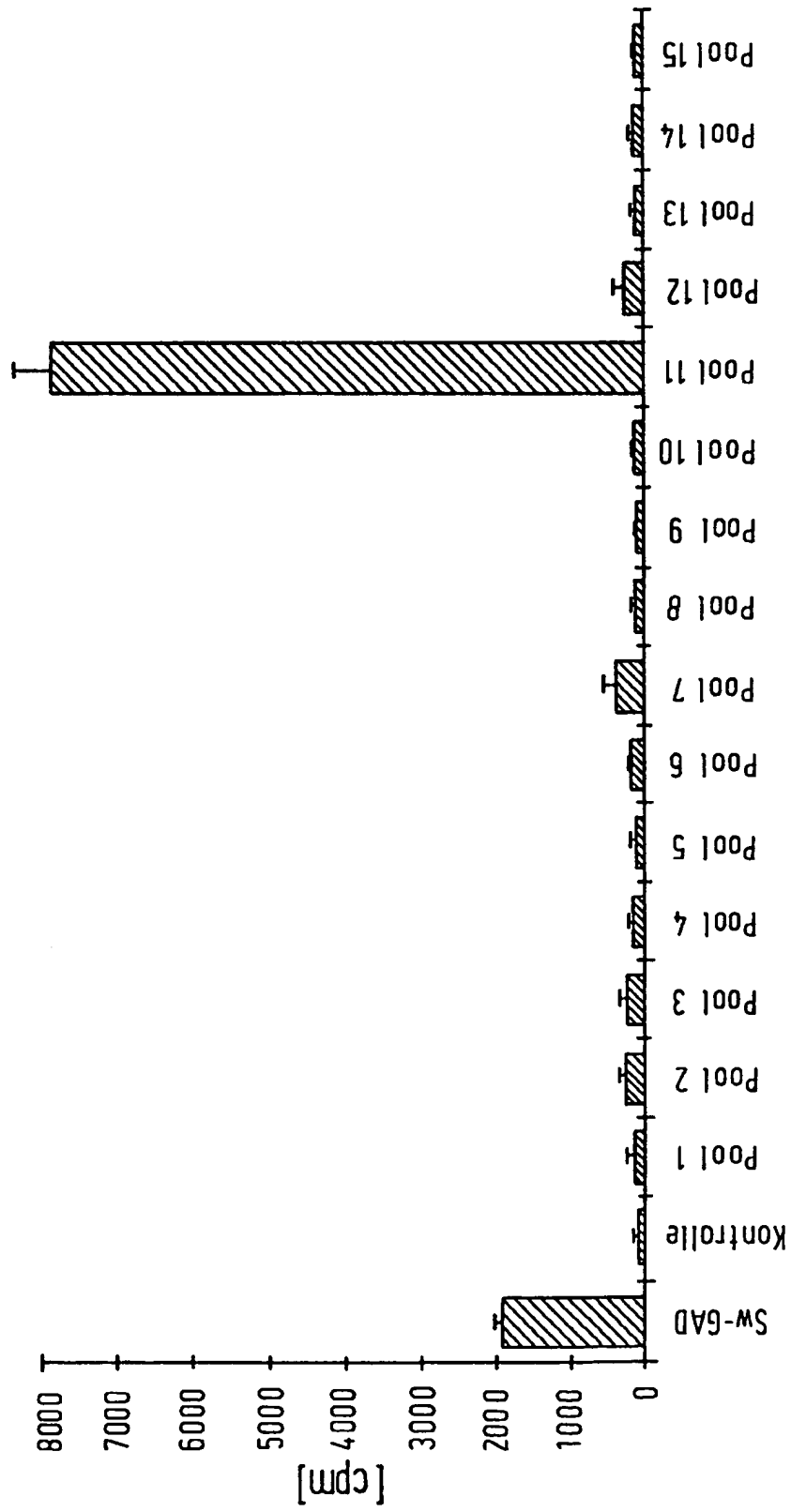


Abb. 4

Proliferationsassay Pat. 6/10 mit Peptiden

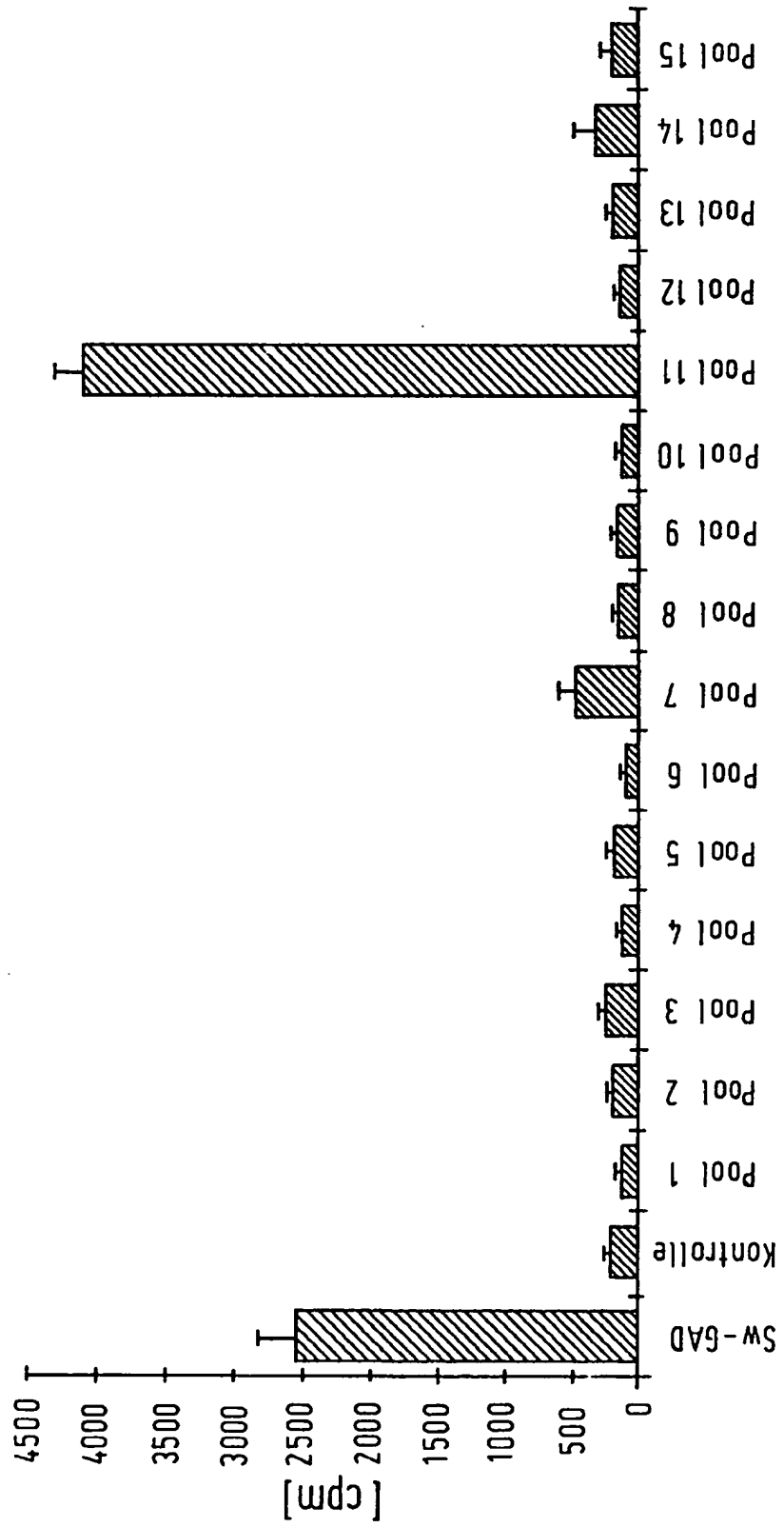


Abb. 5

Proliferationsassay Pat. 6/7 mit Einzelpeptiden aus Pool 7 und 11

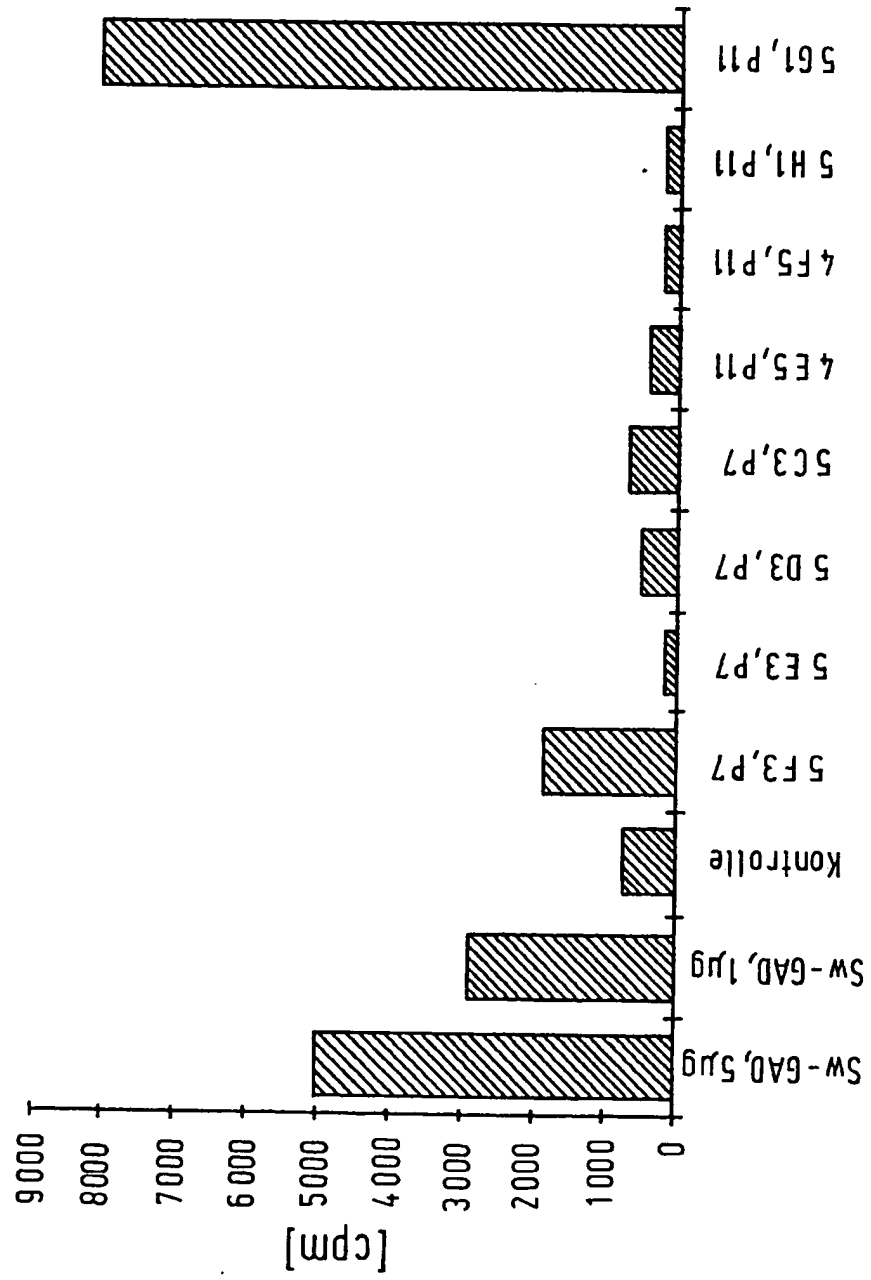


Abb. 6

Proliferationsassay Pat. 6/10 mit Einzelpeptiden aus Pool 7 und 11

